家蚕滞育关联山梨醇脱氢酶基因的启动子活性分析

朱　娟[1,2], 谢雨辰[1,2], 陈艳荣[1,2], 唐顺明[1,2], 易咏竹[1,2], 沈兴家[1,2,*]

(1. 江苏科技大学生物技术学院, 江苏省蚕桑生物学与生物技术重点实验室, 江苏镇江 212018;
2. 中国农业科学院蚕业研究所, 农业部蚕桑遗传改良重点实验室, 江苏镇江 212018)

摘要:【目的】明确家蚕 *Bombyx mori* 滞育关联基因山梨醇脱氢酶基因 *BmSDH*(*BmSDH*-1, *BmSDH-2a* 和 *BmSDH-2b*)的转录特性。【方法】用 5′RACE 技术确定家蚕 3 个 *BmSDH* 基因的转录起始位点。利用 PCR 技术克隆 3 个 *BmSDH* 基因约 1 kb 及 *BmSDH-2a* 不同长度的启动子区序列,分别构建带有萤火虫荧光素酶报告基因的载体 pGL3-*BmSDH*-P-*luc*,并与 pRL-CMV 报告质粒(含海肾荧光素酶报告基因)共转染家蚕 BmN 细胞,通过双荧光素酶检测系统检测 *BmSDH* 基因启动子活性;分别在 BmN 细胞培养基中添加昆虫保幼激素、蜕皮激素和滞育激素,通过双荧光素酶检测系统检测不同浓度激素处理对 *BmSDH-2a* 基因启动子活性的影响。【结果】*BmSDH*-1 的转录起始位点为 A(-41),*BmSDH-2a* 的转录起始位点为 C(-41),*BmSDH-2b* 的转录起始位点为 A(-40)(翻译起始位点为 +1)。双荧光素酶检测结果表明,*BmSDH-2a* 启动子活性极显著高于 *BmSDH*-1 和 *BmSDH-2b* 启动子,*BmSDH-2a* 355 bp 长度片段的启动子活性极显著高于 674 bp 和 1 117 bp 长度片段。用不同浓度滞育激素处理 BmN 细胞后,*BmSDH-2a* 的 1 117 bp 启动子活性随着滞育激素浓度的升高有上升的趋势,当浓度高于 100 ng/mL 时启动子活性有所降低但仍保持在较高水平;用保幼激素进行处理后,随着激素浓度的升高启动子活性逐渐降低;蜕皮激素处理后,0.1 ng/mL 激素显著增强启动子活性,当激素浓度继续升高启动子活性逐渐降低。【结论】确定了 *BmSDH* 基因的转录起始位点。*BmSDH-2a* 启动子活性显著高于 *BmSDH-1* 和 *BmSDH-2b* 启动子,一定浓度的蜕皮激素能显著提高 *BmSDH-2a* 启动子活性。研究结果有助于阐明 *BmSDH* 基因在家蚕滞育中的功能。

关键词: 家蚕; 启动子; 山梨醇脱氢酶; 滞育; 转录起始位点; 表达调控

中图分类号: Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2018)04-0391-07

Determination of the promoter activity of diapause-associated sorbitol dehydrogenase genes in the silkworm, *Bombyx mori*

ZHU Juan[1,2], XIE Yu-Chen[1,2], CHEN Yan-Rong[1,2], TANG Shun-Ming[1,2], YI Yong-Zhu[1,2], SHEN Xing-Jia[1,2,*] (1. Jiangsu Key Laboratory of Sericultural Biology and Biotechnology, College of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang, Jiangsu 212018, China; 2. Key Laboratory of Silkworm and Mulberry Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang, Jiangsu 212018, China)

Abstract:【Aim】To clarify the transcriptional characteristics of sorbitol dehydrogenase (BmSDH) genes (*BmSDH*-1, *BmSDH-2a* and *BmSDH-2b*) in the silkworm, *Bombyx mori*.【Methods】The transcription initiation sites of three *BmSDH* genes were determined by 5′RACE technique. The promoters of *BmSDH* about 1 kb in length and *BmSDH-2a* in different lengths were cloned by PCR. Then report plasmids with a fruit fly luciferase gene driven by *BmSDH* promoters in different lengths, pGL3-*BmSDH*-P-*luc*, were

基金项目: 国家自然科学基金项目(31672490); 江苏省自然科学基金项目(BK20151322); 江苏省高校自然科学研究重大项目(15KJA180001)
作者简介: 朱娟, 女, 1988 年 12 月生, 江苏盐城人, 博士研究生, 研究方向基因表达调控, E-mail: zhujuan0647@sina.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: shenxjsri@163.com
收稿日期 Received: 2017-10-11; 接受日期 Accepted: 2018-01-15

constructed. Using dual luciferase detection system, the promoter activity of *BmSDH* was detected by co-transfecting the BmN cells with pGL3-*BmSDH*-P-*luc* and pRL-CMV which contains a renin-luciferase reporter gene, and the effects of hormones on the promoter activity of *BmSDH-2a* was detected by adding juvenile hormone analogue (JHA), ecdysone hormone (20E) and diapause hormone (DH), respectively, to culture media in the gradient concentrations.【Results】The transcription initiation sites of *BmSDH*-1, *BmSDH-2a* and *BmSDH-2b* are located at 41, 41 and 40 bp upstream the translation initiation site, respectively. The promoter activity of *BmSDH-2a* was significantly higher than those of *BmSDH*-1 and *BmSDH-2b*. For the *BmSDH-2a* gene, the promoter activity of the 355 bp fragment was significantly higher than those of the 674 bp and 1 117 bp fragments. In BmN cells, the activity of 1 117 bp promoter of *BmSDH-2a* increased with the increase of DH concentration; however, when the DH concentration was higher than 100 ng/mL, the promoter activity was decreased to some degree but maintained at a high level. In JHA treated BmN cells, the promoter activity was decreased gradually as the hormone concentration increased. In 20E treated BmN cells, the promoter activity significantly increased when 0. 1 ng/mL of 20E was applied, and then decreased gradually with the increase of hormone concentration.【Conclusion】The transcription initiation sites of the *BmSDH* genes were determined. The promoter activity of *BmSDH-2a* is significantly higher than those of *BmSDH*-1 and *BmSDH-2b*. A certain concentration of 20E can significantly enhance the promoter activity of *BmSDH-2a*. These results will contribute to clarifying the function of *BmSDH* genes in diapause process in *B. mori*.

Key words: *Bombyx mori*; promoter; sorbitol hydrogenase; diapause; transcription initiation site; expression regulation

滞育是由基因调控的比休眠更深的一种新陈代谢受抑制的生理阶段,可以使昆虫度过不良环境,也可以调节个体发育,使整个群体发育整齐以利于雌雄个体间的交配,从而保证物种的繁衍(Denlinger, 1986, 2002)。对昆虫滞育机制的研究将有利于经济昆虫的开发利用和农林害虫的防治。家蚕 *Bombyx mori* 是典型的以卵滞育的昆虫,可作为研究滞育机理的模式生物,因此家蚕滞育一直受到国内外学者的关注。

家蚕卵的滞育由母体咽下神经节分泌并作用于蛹期卵巢的滞育激素调控,滞育开始于蚕卵中胚层分裂完成时(Nakagaki *et al*., 1991)。随着滞育的开始,蚕卵中储存的糖原转化为山梨醇和甘油,它们可能作为防冻剂来保护细胞的结构和基本功能。大量的山梨醇也可能是用来抑制胚胎细胞的发育(Takahashi *et al*., 1971)。而当滞育卵经过5℃低温长期(30 d 以上)冷藏,或短期冷藏并浸酸处理,可以打破滞育,山梨醇又转化成糖原为细胞的发育提供营养。可见山梨醇的含量与滞育的发动、持续和解除具有密切的平行关系(Niimi and Yaginuma, 1992; Niimi *et al*., 1993a, 1993b),山梨醇脱氢酶(sorbitol dehydrogenase, SDH)是调节催化山梨醇代谢的关键酶,因此对家蚕 *BmSDH* 的研究将帮助我们进一步理解滞育的分子机制。

家蚕有 3 个 *BmSDH* 基因,即 *BmSDH*-1, *BmSDH-2a* 和 *BmSDH-2b*,均为单拷贝,分别位于第21号染色体的不同位点(Rubio *et al*., 2011)。前期我们用半定量 PCR 的方法分析了 *BmSDH* 表达的时空特异性(朱娟等, 2014)。本研究以家蚕二化性品种“秋丰”为材料,分析了 *BmSDH* 基因的转录起始位点及其启动子的特性,为进一步的 *BmSDH* 转录调控研究奠定基础和阐释家蚕滞育的分子机制积累实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试家蚕二化性品种“秋丰”由农业部蚕桑遗传改良重点实验室保存,常温桑叶 *Folium mori* 饲养。以家蚕5龄第3天幼虫的后部丝腺组织为材料,提取基因组 DNA;取家蚕蛹期第3天卵巢组织为材料,提取总 RNA。家蚕培养细胞 BmN(本实验室保存),用含10%胎牛血清和双抗(氨苄青霉素和链霉素)的 TC100 培养基27℃培养;转染试剂 Entranster^{TM}-H4000,为北京英格恩生物科技有限公司产品;双荧光素酶检测试剂盒(E1910),为

Promega 公司产品；β-蜕皮激素由中国农业科学院蚕业研究所附属蚕药厂提供，保幼激素类似物购自 Sigma 公司，滞育激素（MW：2 731.01）由上海强耀生物科技有限公司合成；pGL3-Basic 和 pRL-CMV 质粒均由本实验室保存。

1.2　*BmSDH-1*，*BmSDH-2a* 和 *BmSDH-2b* 基因转录起始位点的确定

家蚕蛹期第 3 天卵巢组织总 RNA 用 Trizol 法提取，根据 START™ RACE Kit 试剂盒提供的方法制备 5′ RACE 准备 cDNA，采用 Oligo7.0 软件设计 5′ RACE 特异引物 BmSDH-GSP1 和 BmSDH-GSP2，交由上海生工公司合成（表 1）。用特异引物 BmSDH-GSP1，BmSDH-GSP2 和试剂盒中通用上游引物 Universal Primer A Mix（UPM），按照试剂盒提供的方法，进行 5′ RACE PCR 扩增。第 1 轮 touchdown PCR 扩增程序：94℃ 30 s，72℃ 3 min，5 个循环；94℃ 30 s，70℃ 30 s，72℃ 3 min，5 个循环；94℃ 30 s，68℃ 30 s，72℃ 3 min，25 个循环。以第 1 轮扩增产物为模板进行第 2 轮扩增，扩增程序：95℃ 5 min；94℃ 30 s，65℃ 30 s，72℃ 1 min，30 个循环；72℃，10 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。将第 2 轮 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接，挑取单克隆送上海生工公司测序，分析确定家蚕 *BmSDH* 基因转录起始位点。

表 1　实验用引物

Table 1　List of primers used

引物 Primers	引物序列（5′－3′） Primer sequence	引物用途 Purpose
BmSDH-1-GSP1	GAGCGACTCTCTGCGCCGACCCGTACCC	5′ RACE
BmSDH-2a-GSP1	CTCCCATGCCGACCAGCACCGCCACGCC	
BmSDH-2b-GSP1	CGCTCCCATGCCGACCAGCACCGCCACG	
BmSDH-1-GSP2	TCCCTCGCTTGCACAGCTCACAGGACCG	
BmSDH-2a-GSP2	GACACGGCACGCCGGGCTCTATGGCCAC	
BmSDH-2b-GSP2	TCCGTGTACTGGGGGCGTGGCGCAGAAG	
BmSDH-2a-1117F	<u>CTCGAG</u>GGGATGCTGACTATACGAT	启动子片段扩增 Promoter fragment amplification
BmSDH-2a-674F	<u>CTCGAG</u>AACAATGCTGCACAGGGAA	
BmSDH-2a-355F	<u>CTCGAG</u>TCATGTTTTTCGGCGACCCT	
BmSDH-2a-1117R	<u>CCATGG</u>CGGTTAGGTTATCTGTGGCCA	
BmSDH-2b-1104F	<u>CTCGAG</u>CACTAAGCCTAATGATTCGT	
BmSDH-2b-1104R	<u>CCATGG</u>TTATGTTATCTGTGGCCAT	
BmSDH-1-1136F	<u>CTCGAG</u>CCCACCCTTCAAACCGTAAC	
BmSDH-1-1136R	<u>CCATGG</u>TAGTTCTCGGTCATCTTGCA	

下划线标记部分 CTCGAG 和 CCATGG 分别为 *Xho*I 和 *Nco*I 的酶切位点。Underlined parts CTCGAG and CCATGG are the restriction sites of *Xho*I and *Nco*I，respectively.

1.3　家蚕 *BmSDH* 基因启动子及 *BmSDH-2a* 基因逐段缺失启动子片段的 PCR 扩增

1.3.1　启动子 5′侧翼区序列克隆：利用在线软件 NNPP（http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html），Alibaba2.1（http://gene-regulation.com/pub/programs/alibaba2/index.html）以及 DNAStar 软件对家蚕数据库（http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/）中 *BmSDH*-1，*BmSDH-2a*，*BmSDH-2b* 基因上游序列进行生物信息学分析，选取相应启动子区核苷酸序列，应用 Oligo7.0 软件设计用于扩增 *BmSDH* 基因启动子区的引物（表 1），引物由上海生工公司合成。

以家蚕 5 龄第 3 天幼虫丝腺基因组 DNA 为模板，用引物 BmSDH-F/R 扩增家蚕 *BmSDH* 基因启动子 5′侧翼区，反应体系：10 × Ex Taq buffer 2 μL，dNTPs（2.5 mmol/L）2 μL，Ex Taq（5 U/μL）0.25 μL，ddH_2O 13.75 μL，模板 DNA 1 μL，上/下游引物（10 μmol/L）0.5 μL，共 20 μL。PCR 扩增程序：94℃ 5 min；94℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 1 min，30 个循环；72℃ 10 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物，切胶回收纯化后，与 pMD18-T 载体于 16℃ 连接过夜，连接产物转化感受态细胞 TOP10，涂布于含氨苄青霉素的 LB 固体培养基，37℃ 培养 10 h。挑选阳性单克隆菌落，经酶切鉴定正确后，送上

海生工公司测序。

1.3.2 *BmSDH-2a* 启动子 3 个逐段缺失片段的 PCR 扩增：通过家蚕数据库检索并下载 *BmSDH-2a* 基因上游启动子序列，利用 DNAStar 软件预测 *BmSDH-2a* 基因启动子区可能的转录因子结合位点。根据软件预测的结合位点，设计 2 条逐段缺失启动子序列的 5′端包含 *Xho* Ⅰ 酶切位点的上游引物和 1 条 5′端包含 *Nco* Ⅰ 酶切位点的下游引物，引物相关信息见表 1，由上海生工公司合成。

以家蚕 5 龄第 3 天幼虫丝腺基因组 DNA 为模板，分别用上游引物 BmSDH-2a-1117F，BmSDH-2a-674F，BmSDH-2a-355F 和下游引物 BmSDH-2a-1117R 进行 PCR 反应。PCR 反应体系同 1.3.1 节。PCR 扩增程序：94℃ 5 min；94℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 30 s，35 个循环；72℃ 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖胶电泳检测，胶回收后送上海生工公司测序。

1.4 双荧光素酶报告基因载体的构建

pGL3-Basic 载体含有荧光素酶报告基因，不含启动子和增强子。将纯化的家蚕 *BmSDH* 基因启动子目的片段和 pGL3-Basic 载体分别用 *Xho* Ⅰ 和 *Nco* Ⅰ 于 37℃ 双酶切 2 h，琼脂糖凝胶电泳检测，并切胶回收目的片段。将回收的目的片段与 pGL3-Basic 载体用 T4 DNA 连接酶连接，16℃ 连接过夜。连接产物转化感受态细胞 TOP10，涂布于含氨苄青霉素的 LB 固体培养基，37℃ 培养 10～12 h，挑选阳性单克隆菌落，37℃ 下 220 r/min 摇菌培养 12 h。取菌液提取重组质粒，经 *Xho* Ⅰ 和 *Nco* Ⅰ 双酶切鉴定正确后，送上海生工公司测序。

1.5 BmN 细胞的培养与转染

在 12 孔细胞培养板中按每孔 950 μL 加入从细胞生长状况良好的培养瓶中轻缓吹打下来的 BmN 细胞悬浮液约 1×10^5 个细胞，设 3 个复孔，过夜培养，使其贴壁。在 1.5 mL EP 管中分别准备两种溶液，A 液：用不含抗生素和 FBS 的 TC-100 培养基稀释 400 ng pGL3-*BmSDH*-P-*luc* 质粒 DNA 和 100 ng pRL-CMV 质粒（内参质粒）；B 液：将 2 μL 的 Entranster™-H4000 转染试剂用不含抗生素和 FBS 的 TC-100 培养基稀释。将 A 和 B 两种溶液分别混匀后，将两者均匀混合，室温放置 15 min。A 和 B 混合液加入含细胞和完全培养基的细胞孔中，以 pGL3-Basic 转染的细胞为空白对照。激素处理试验中，27℃转染 6 h 后更换含不同浓度（0.1，1，10，100，1 000 和 10 000 ng/mL）滞育激素（DH）、保幼激素（JHA）和蜕皮激素（20E）的完全培养基，以不加激素处理为对照，细胞均在更换培养基 48 h 后收集，每组试验重复 3 次，并进行 3 次独立实验。

1.6 家蚕 *BmSDH* 基因启动子相对活性的测定

转染 48 h 后，按照 Dua1-Lueiferase® Reporter Assay System 操作说明和 LuminoMeter TD20/20 荧光光度计上检测荧光素酶活性。取 1.5 节转染后细胞裂解液上清 20 μL 加入荧光素酶检测试剂 Ⅱ（LARII）100 μL，测量萤火虫荧光素酶活性，然后加入 Stop& Glo® 试剂 100 μL 猝灭反应，同时启动海肾荧光素酶反应，测量海肾荧光素酶活性。以萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性的比值表示启动子的活性。

1.7 数据分析

启动子活性数据使用 SPSS16.0 软件采用 *t* 检验的方法进行差异显著性分析，$P < 0.05$ 为差异显著，$P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 *BmSDH* 转录起始位点的确定

本研究提取家蚕蛹期第 3 天卵巢组织总 RNA，以 5′ RACE 技术寻找 *BmSDH*-1，*BmSDH-2a* 和 *BmSDH-2b* 基因的转录起始位点。5′RACE 的 PCR 产物电泳结果显示各只有一条有效扩增的 DNA 片段（图 1）。*BmSDH*-1 的转录起始位点为 A（−41），*BmSDH-2a* 的转录起始位点为 C（−41），*BmSDH-2b* 的转录起始位点为 A（−40）（翻译起始位点为 +1），

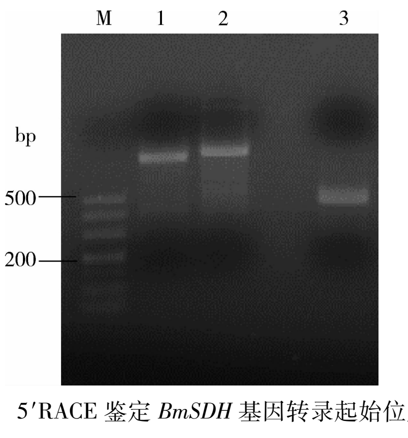


图 1 5′RACE 鉴定 *BmSDH* 基因转录起始位点

Fig. 1 Determination of the transcriptional initiation sites for *BmSDH* by 5′RACE

M：DL500 DNA 分子质量标准 DL500 DNA marker；1：*BmSDH*-1 的 5′RACE 产物 5′RACE product of *BmSDH*-1；2：*BmSDH-2a* 的 5′RACE 产物 5′RACE product of *BmSDH-2a*；3：*BmSDH-2b* 的 5′RACE 产物 5′RACE product of *BmSDH-2b*.

其中 *BmSDH*-1 和 *BmSDH-2a* 基因转录本的起始位点比现有 NCBI 数据库中(D13371.1，AB164059)公布的位置分别向前推移了 36 bp(GGGGAATCATTTCTCAAATAGTTATCGAAGTTAACGGGTTGCAAGATG)和 5 bp(GGGGCAGTAAAGCCGA-GACTGTCAGTGAGATTCCGCGCGTCCGACATG)。

2.2　*BmSDH* 基因启动子的生物信息学及转录活性分析

利用在线软件 NNPP 对 *BmSDH* 基因转录起始位点上游序列进行启动子预测，分别在 *BmSDH*-1 基因 −388 ~338 bp，*BmSDH-2a* 基因 −185 ~ −135 bp 和 *BmSDH-2b* 基因 −176 ~ −126 bp 处得到 score 为 0.95，0.99 和 0.93 的核心启动子区，利用 Alibaba2.1 和 DNAStar 软件对它们的转录因子结合位点进行预测，结果发现其转录因子结合位点多集中在近 1 kb 序列区，其中包括 C/EBP，GATA，Antp，EcR 和 En 等元件。

将构建好的 3 种 *BmSDH* 启动子报告基因重组质粒分别转染家蚕 BmN 细胞，同时共转染内参质粒 pRL-CMV，以萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性的比值表示启动子的活性。启动子活性分析显示，与 pGL3-Basic(无启动子)载体相比，*BmSDH*-1，*BmSDH-2a* 和 *BmSDH-2b* 基因的启动子均有活性，且 *BmSDH-2a* 的启动子的活性极显著高于 *BmSDH*-1(P = 0.002 < 0.01)和 *BmSDH-2b* 的启动子(P = 0.004 < 0.01)，分别是它们的 21 倍和 9.7 倍(图 2)。

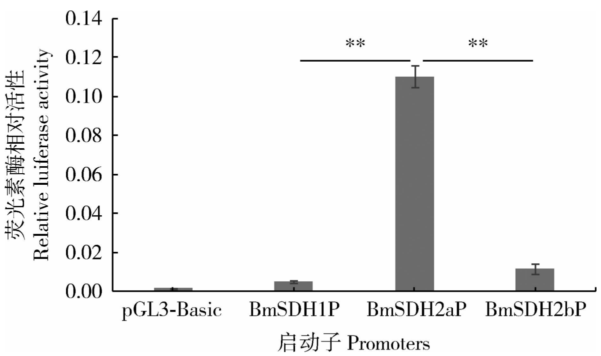


图 2　*BmSDH* 基因启动子在 BmN 细胞中的活性

Fig. 2　Promoter activity of *BmSDH* in BmN cells

数据表示 3 次重复实验的平均值 ± 标准误；采用 t 检验方法，星号表示差异显著(P < 0.05)，双星号表示差异极显著(P < 0.01)；下图同。Data are shown as means ± *SE* of three independent experiments. Single asterisk indicates significant difference (P < 0.05), and double-asterisk indicates extremely significant difference (P < 0.01) by Student's t-test. The same for the following figures.

2.3　*BmSDH-2a* 不同长度启动子片段的转录活性分析

为了进一步了解 *BmSDH-2a* 启动子的特性，我们分别构建了 5′端缺失的不同长度片段的 *BmSDH-2a* 启动子驱动的报告基因重组质粒 pGL3-*BmSDH-2a*P-1117 bp-*luc*，pGL3-*BmSDH-2a*P-674 bp-*luc* 和 pGL3-*BmSDH-2a*P-355 bp-*luc* 与 pRL-CMV 质粒共转染家蚕 BmN 细胞。结果显示，355 bp 长度的 *BmSDH-2a* 启动子活性显著高于 674 bp(P = 0.018 < 0.05)和 1 117 bp 长度的启动子(P = 0.021 < 0.05)，分别是它们的 5.2 倍和 3.4 倍(图 3)。

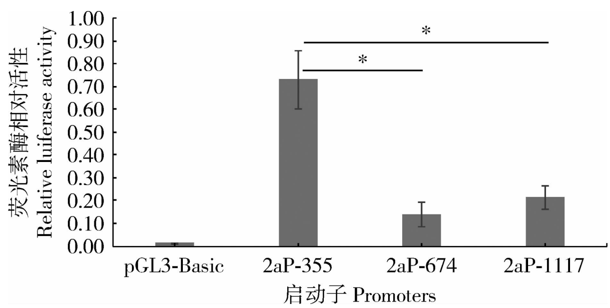


图 3　*BmSDH-2a* 不同长度启动子片段的活性

Fig. 3　Activities of promoter fragments of *BmSDH-2a* in different lengths

2aP-355，2aP-674，2aP-1117 分别表示 *BmSDH-2a* 不同长度(355，674 和 1 117 bp)的启动子片段。2aP-355，2aP-674，2aP-1117 mean the promoter fragments of *BmSDH-2a* in different lengths (355, 674 and 1 117 bp), respectively.

2.4　不同激素处理对 *BmSDH-2a* 启动子活性的影响

滞育激素(DH)、保幼激素(JHA)和蜕皮激素(20E)是家蚕在蛹期第 3 天分泌水平急剧变化的 3 类内分泌激素(Mizoguchi *et al*., 2001；Furuta *et al*., 2013；孟勐，2015)。为探明这 3 类激素对 *BmSDH-2a* 启动子的影响，我们用 pGL-*BmSDH-2a*P-1117 质粒与 pRL-CMV(对照)共转染 BmN 细胞，转染 4 ~ 6 h后，用含有不同浓度激素的细胞培养基替换原培养基，转染 48 h 后收集细胞，检测启动子活性。结果显示 DH 在 0.1 ~100 ng/mL 之间对 *BmSDH-2a* 启动子活性虽然有一个逐渐升高的趋势但差异不显著，在浓度高于 100 ng/mL 时启动子活性维持在较高水平不再有明显变化(图 4)；随着 JHA 浓度的逐渐升高，启动子的活性逐渐降低，分别为对照组的 1.08，0.87，0.78，0.67，0.71 和 0.54 倍，JHA 浓度为 10 000 ng/mL 时启动子活性极显著低于对照

组($P = 0.004 < 0.01$)(图 5);当 20E 浓度为 0.1 ng/mL 时,*BmSDH-2a* 启动子活性降低,是对照组的 0.71 倍,随着 20E 浓度的升高 *BmSDH-2a* 启动子的活性也逐渐升高,当浓度为 100 ng/mL 时活性达到最高,为对照组的 1.76 倍,显著高于对照组($P = 0.026 < 0.05$),在浓度为 1 000 ng/mL 时,活性开始降低(图 6)。

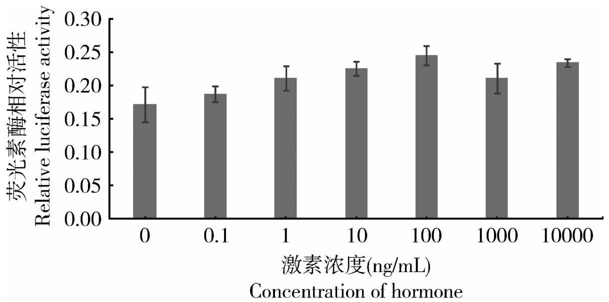


图 4　滞育激素对 *BmSDH-2a* 启动子活性的影响

Fig. 4　Effect of diapause hormone on the promoter activity of *BmSDH-2a*

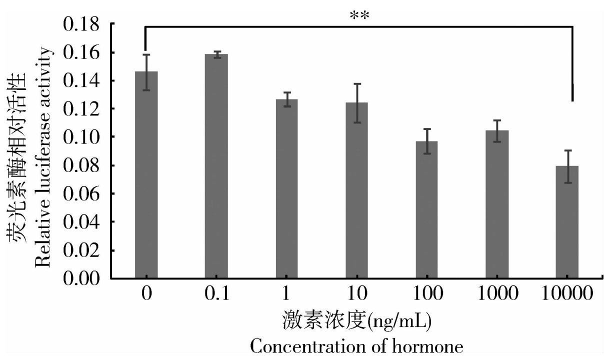


图 5　保幼激素类似物对 *BmSDH-2a* 启动子活性的影响

Fig. 5　Effect of juvenile hormone analogue on the promoter activity of *BmSDH-2a*

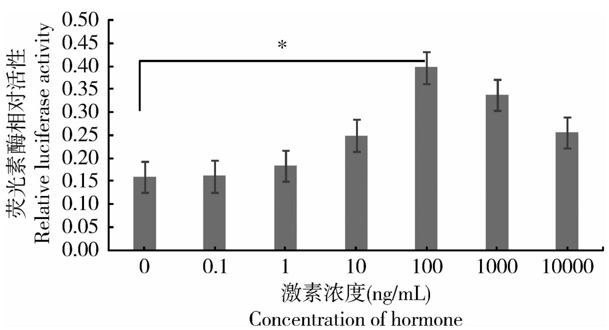


图 6　蜕皮激素对 *BmSDH-2a* 启动子活性的影响

Fig. 6　Effect of 20E on the promoter activity of *BmSDH-2a*

3　讨论

根据家蚕二化性品种子代滞育性受亲代胚胎期催青条件调控的原理,我们前期利用半定量的方法分析了 *BmSDH* 在常温(25℃)和低温(17℃)催青处理条件下的亲代及其子代卵的表达情况,发现 *BmSDH*-1 基因的转录水平无明显差异;而 *BmSDH-2a* 和 *BmSDH-2b* 基因则不同,低温催青处理这 2 个基因在家蚕 5 龄第 3 天幼虫的卵巢和血淋巴组织中的转录水平明显低于常温催青处理,在蛹期第 3 天的卵巢和血淋巴中却明显高于常温处理,在滞育维持到滞育解除这一进程中,家蚕卵内原本作为防冻剂功能的山梨醇逐步转化为生长发育所需要的糖原,而 SDH 是山梨醇转化为糖原的关键酶,提示这 2 个基因与家蚕二化性品种的滞育有重要关系。

为了进一步探明 *BmSDH* 基因的转录活性,本研究对 *BmSDH*-1, *BmSDH-2a* 和 *BmSDH-2b* 基因的启动子活性进行分析。结果表明,*BmSDH-2a* 的启动子活性极显著高于 *BmSDH-2b* 和 *BmSDH*-1,分别是 *BmSDH-2b* 和 *BmSDH*-1 的 9.7 倍和 21 倍,说明 *BmSDH* 的活性主要来自 *BmSDH-2a* 和 *BmSDH-2b*,这一推论与 Rubio 等(2011)在打破滞育的卵中没有检测到 *BmSDH*-1(当时并未发现 *BmSDH-2a* 和 *BmSDH-2b*)蛋白的表达的结果相佐证。为进一步研究 *BmSDH-2a* 基因启动子的特性,我们对 *BmSDH-2a* 不同 5′侧翼截短的启动子活性进行检测,发现 355 bp 的启动子活性极显著高于 674 bp 和 1 117 bp 长度启动子,分别是它们的 5.2 倍和 3.4 倍。提示在 355 -674 bp 及 674 -1 117 bp 区间存在负调控元件,我们对这一区域的序列进行分析,发现多次出现 En(Engrailed)元件,此元件对果蝇某些基因在转录水平有抑制作用(Smith and Jaynes, 1996),推测 En 元件在 *BmSDH-2a* 转录过程中起负调控的作用。

家蚕的发育受多种激素的协同调控。激素对家蚕滞育的调控是一个复杂的网络系统。从蛹期第 2 -3天,家蚕体内的 DH 和 20E 的滴度都急剧升高达到10 000 ng/mL,而 JH 在家蚕眠期以及化蛹期的滴度较高,但在其他时期都处于较低水平(孟勐, 2015)。本研究模拟家蚕体内激素浓度,对 *BmSDH-2a* 启动子驱动的报告质粒转染的 BmN 细胞培养基中添加不同种类和浓度的激素,DH 浓度在 0.1 ~ 100 ng/mL 以内,启动子活性有逐渐升高的趋势,浓度高于 100 ng/mL 时启动子活性有所降低但仍维持

在较高水平；添加 JHA 时，随着 JHA 浓度的升高 *BmSDH-2a* 启动子的活性逐渐降低，这可能是由于高浓度的 JHA 对细胞的生理造成影响，导致启动子活性降低；20E 浓度在 0.1 ~ 100 ng/mL 时，*BmSDH-2a* 启动子活性逐渐升高，推测在这段 5′侧翼区存在与 20E 结合的调控因子。软件分析发现该区域存在 EcR（Luo *et al.*, 1991；孟勐, 2015）和 Antp（孟勐, 2015）2 个与 20E 相关的元件，并未发现滞育激素和保幼激素的相关结合元件；随着 20E 浓度的继续升高，*BmSDH-2a* 启动子的活性逐渐降低，推测也是与高浓度的激素对细胞的生理产生影响有关。

上述结果为进一步探究山梨醇脱氢酶基因的转录调控机制奠定基础，为阐明家蚕滞育的分子机制提供了实验数据。

参考文献（References）

Denlinger DL, 1986. Dormancy in tropical insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 31: 239 – 264.

Denlinger DL, 2002. Regulation of diapause. *Annu. Rev. Entomol.*, 47: 93 – 122.

Furuta K, Ichikawa A, Murata M, Kuwano E, Shinoda T, Shiotsuki T, 2013. Determination by LC-MS of juvenile hormone titers in hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77(5): 988 – 991.

Luo Y, Amin J, Voellmy R, 1991. Ecdysterone receptor is a sequence-specific transcription factor involved in the developmental regulation of heat shock genes. *Mol. Cell. Biol.*, 11(7): 3660 – 3675.

Meng M, 2015. Regulation of Homeodomain Transcription Factors on the Biosynthesis of Juvenile Hormone and 20-Hydroxyecdysone in the Silkworm. PhD Dissertation, Southwest University, Chongqing. 14 – 22. [孟勐, 2015. Homeodomain 转录因子对家蚕保幼激素及蜕皮激素合成的调控. 重庆: 西南大学博士学位论文. 14 – 22]

Mizoguchi A, Ohashi Y, Hosoda K, Ishibashi J, Kataoka H, 2001. Developmental profile of the changes in the prothoracicotropic hormone titer in hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*: correlation with ecdysteroid secretion. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 31(4 – 5): 349 – 358.

Nakagaki M, Takei R, Nagashima E, Yaginuma T, 1991. Cell cycles in embryos of the silkworm, *Bombyx mori*: G2-arrest at diapause stage. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 200(4): 223 – 229.

Niimi T, Yaginuma T, 1992. Biosynthesis of NAD-sorbitol dehydrogenase is induced by acclimation at 5℃ in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Molec. Biol.*, 102(1): 169 – 173.

Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T, 1993a. A cold-inducible *Bombyx* gene encoding a protein similar to mammalian sorbitol dehydrogenase. Yolk nuclei-dependent gene expression in diapause eggs. *Eur. J. Biochem.*, 213(3): 1125 – 1131.

Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T, 1993b. Developmental profile of the gene expression of a *Bombyx* homolog of mammalian sorbitol dehydrogenase during embryogenesis in non-diapause eggs. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Molec. Biol.*, 106(2): 437 – 442.

Rubio RO, Suzuki A, Mitsumasu K, Homma T, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T, 2011. Cloning of cDNAs encoding sorbitol dehydrogenase-2a and b, enzymatic characterization, and up-regulated expression of the genes in *Bombyx mori* diapause eggs exposed to 5℃. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 41(6): 378 – 387.

Smith ST, Jaynes JB, 1996. A conserved region of engrailed, shared among all en-, gsc-, Nk1-, Nk2- and msh-class homeoproteins, mediates active transcriptional repression *in vivo*. *Development*, 122(10): 3141 – 3150.

Takahashi SY, Ohnishi E, Yoshitake N, 1971. Sorbitol in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev. Growth Differ.*, 13(2): 89 – 95.

Zhu J, Wang X, Wei BY, Tang SM, Huang JS, Hao BF, Shen XJ, 2014. Transcriptional characteristics of sorbitol dehydrogenase gene in silkworm, *Bombyx mori*. *China Sericul.*, 35(2): 4 – 7. [朱娟, 王欣, 韦博尤, 唐顺明, 黄金山, 郝碧芳, 沈兴家, 2014. 家蚕山梨醇脱氢酶基因的转录水平特性分析. 中国蚕业, 35(2): 4 – 7]

（责任编辑：马丽萍）